

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以靈芝殘渣去乙醯物質開發機能性米食製品 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2313-B-041-005-
執行期間：96年08月01日至97年07月31日
執行單位：嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

計畫主持人：顏名聰
共同主持人：毛正倫
計畫參與人員：大專生-兼任助理人員：劉育明



處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 97年11月04日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以靈芝殘渣去乙醯物質開發機能性米食製品

計畫類別： 個別型計畫（新進人員計畫）

計畫編號： NSC 96-2313-B-041-005-

執行期間： 96 年08 月01 日至97 年07 月31 日

執行單位： 嘉南藥理科技大學生活應用與保健系



主持人： 顏名聰 嘉南藥理科技大學 生活應用與保健系

協同主持人： 毛正倫 中興大學 食品暨應用生物科技學系

計畫參與人員： 劉育明 嘉南藥理科技大學 生活應用與保健系

報告類型： 精簡報告

中 華 民 國 9 7 年 1 1 月 0 3 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以靈芝殘渣去乙醯物質開發機能性米食製品

Development of as a functional rice products using the N-deacetylation from residual of *Ganoderma tsugae*

計畫編號：NSC 96-2313-B-041-005-

執行期限：96 年8 月1 日至97 年7 月31 日

主持人：顏名聰 嘉南藥理科技大學 生活應用與保健系

ymingt@gmail.com

協同主持人：毛正倫 中興大學食品暨應用 生物科技學系

計畫參與人員：劉育明 嘉南藥理科技大學 生活應用與保健系

一、中文摘要

幾丁質(Chitin)是以N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)為單元的鏈狀多醣聚合物。幾丁聚醣(Chitosan)則是幾丁質經去乙醯化反應後產生之部份或全部去乙醯化產物。目前市售葡萄糖胺及其衍生物主要由蝦、蟹殼或魷魚與烏賊的軟骨經酸鹼處理而得，對於素食主義者而言，葡萄糖胺及其衍生物的來源是個值得重視的問題。靈芝經萃取出多醣體後，會產生大量的靈芝殘渣，這些靈芝殘渣的細胞壁中含豐富的幾丁質。本研究則自靈芝殘渣中製備去乙醯物質，探討其組成份及理化性質。結果顯示靈芝殘渣糖幾丁質產率為56.43%；靈芝殘渣去乙醯物質之產率為27.62~30.48%，靈芝殘渣去乙醯物之去乙醯程度為89.63%，分子量為89.47 KDa，靈芝殘渣去乙醯物之組成份中總醣、粗纖維、粗蛋白及粗脂肪分別為49.71、29.47、8.42及0.33%。在X-ray繞射結果，在 2θ 19°及20.3°有明顯波峰出現。DSC分析發現其吸熱峰之熱焓值為135.49 J/g。所以本研究自靈芝殘渣製備真菌去乙醯物質，希望進而在醫藥及食品上有其特殊的應用價值，並可為廢棄物資源化提供良好參考，也可以提供素食者在保健食品上的另一個選擇。

關鍵字：靈芝殘渣、去乙醯物質、糖幾丁聚糖、理化性質

Abstract

After hot water extraction, large quantity of *Ganoderma tsugae* Murrill, residue was left,

has no economical value and exploitation, which was rich in chitin, far abundant from mycelia. Chitin is a second abundant natural polymer after cellulose and possesses many beneficially biological activities. Chitosan is prepared by the N-deacetylation of chitin with hot alkali and is a β -(1 \rightarrow 4)-linked 2-amido-2-deoxy-D-glucan polysaccharide. Chitin and chitosan has been used in a wide variety of applications, such as in sewage treatment, agriculture, medicine, cosmetics, food processing and biotechnology, the functional components in N-deacetylation glucochitosan for widely application in health foods. The research also studied the composition, physicochemical properties and structure analysis of glucochitosan prepared.

The production yield was 56.43 and 27.62~30.48% for glucochitin and the Ling chih residue by the N-deacetylation, respectively. The Ling chih residue by the N-deacetylation the degree of N-deacetylation of 89.63%, the molecular weights of the Ling chih residue by the N-deacetylation was 89.47 kDa.

The Ling chih residue by the N-deacetylation contained of total sugar, Crude fiber, protein and fat contents were (49.71%, 29.47%, 8.42% and 0.33%, respectively).

X-ray diffraction analysis showed that the Ling chih residue by the N-deacetylation exhibited a peak at 19 and 20.3 at 2θ , respectively. The thermal behaviors of Ling chih residue by the N-deacetylation examined by DSC showed one endotherm and enthalpy of 135.49 J/g.

The results obtained herein are valuable for the development and application of new health foods.

Keywords: Ling chih residue, N-deacetylation, Glucochitosan, Physicochemical properties

二、緣由及目的

近年來國人對飲食的訴求趨於多樣化與強調保健食品機能性成份之療效，部份真菌（菇類）的子實體及菌絲體可當作食品及用於醫療，近來很多文獻報導指出靈芝、樟芝、香菇、舞菇、冬蟲夏草、木耳等，的確具有生物活性，如具有提昇免疫力、抗腫瘤、延緩衰老、降血脂、抗氧化等等功效，行政院國科會『保健食品跨部會整合推動委員會』，針對健康食品市場的潛力分析結果，規劃食藥用菇類為第一優先開發目標，顯然將其研發成保健食品，可行性是最高的，也最具前瞻性。稻米，是人類的主食之一，而稻米的食用方式除了以整粒的型式，如米糕及肉粽；亦有是以穀粉的方式如中式傳統澱粉質米食加工製品，如年糕、發糕、湯圓、麻糬、九層糕及腸粉。松杉靈芝經由熱水萃取出水草物後會產生大量的靈芝殘渣，目前仍無任何經濟價值與開發，這些殘渣的細胞壁中含有豐富的幾丁質，且子實體中幾丁質含量較菌絲體中豐富。幾丁質為自然界中僅次於纖維素之第二豐富的自然聚合物，具有許多生物活性；幾丁質經熱鹼進行去乙醯作用後可製得幾丁聚醣，作為目前高附加價值的產業發展，如紡織工業、醫藥、化妝品、抑菌劑、食品添加物、保健食品及生物技術等。因此本計劃以松杉靈芝經由熱水萃取出具生物活性物質後，所產生的大量廢棄物靈芝殘渣進行去乙醯作用，取得去乙醯物質添加於米食製品中，並對這些米食製品進行功能性評估，以其開拓米食製品之保健食品，並提昇我國傳統米食的應用，也可以增加廢棄物生技能源之利用。

幾丁質廣存於動植物界中，在自然界中的含量僅次於纖維素（Knorr, 1984），如蝦蟹外殼、昆蟲外殼、軟體動物外殼，以及藻類、真菌或酵母菌的細胞壁中，均含有一定量的幾丁質（Austin et al., 1981）。然而幾丁聚醣（chitosan）於自然界中的含量則相當少，僅在接合菌類（Zygomycetes）細胞壁中被發現（Davis and Hayes, 1988）。現今幾丁質在健康食品、醫療生化、農業、化工、廢水處理、紡織工業與化妝品工業等各方面均有廣泛的應用（Muzzarelli, 1996）。幾丁聚醣（chitosan）是將幾丁質以高濃度熱鹼處理，進行去乙醯作用去除部分或是全部的乙醯基，露出游離基之產物（Knorr, 1984; Grant et al., 1988; 林, 1992）。Muzzarelli和Rocchetti（1985）認為總氮含量佔整個聚合物重量7%以上者即為幾丁聚醣。幾丁聚醣具有明顯抑菌作用，其抗菌力受到黏度及去乙醯度所影響，黏度越低，去乙醯度越高者抗菌力越大。此外抗菌效果與pH值有關，酸性時所含胺基成陽離子狀故抗菌力強，在中性及鹼性環境時抗菌力減弱，因此幾丁聚醣為陽離子型的高分子且具有抗菌效果。幾丁聚醣之抗菌機制尚不清楚，但一般認為幾丁聚醣在酸性溶液下，原有的NH₂官能基會質子化變成NH₃⁺，而此帶正電荷之官能基會與微生物細胞膜表面之負電荷作用，增加細胞壁之通透性，造成蛋白質類物質及其他細胞內組成份之流失（林, 1995）。

松杉靈芝（*Ganoderma tsugae* Murrill）在分類學上隸屬於真菌界、擔子菌門

(Basidiomycota)、同擔子菌綱 (Hymenomycetes)、靈芝目 (*Ganodermatales*)、靈芝科 (*Ganodermataceae*)、靈芝屬 (*Ganoderma*) (Hawksworth *et al.*, 1996)。一般認為靈芝的功效可以廣至清血、解毒、益腎、保肝、強心、調壓、抗過敏、抗發炎、鎮痛、鎮靜、抗腫瘤、調節免疫力等功能。現代醫學更嘗試以科學方法進行靈芝成分分析，在靈芝的功效與成分間找出關聯性。研究指出，靈芝菌傘之菌絲體是藥效的寶庫，其活性成分有高分子多醣體、有機銻、有機硒、小分子蛋白質、腺苷、胺基酸、三萜類、酵素及多種人體必需之礦物質及維生素等。食藥用菇類之生理活性物質中，常被學者研究的為靈芝之多醣體與三萜類（如靈芝酸等物質）（陳等，1996）及香菇子實體所含之香菇嘌呤（eritadenine）等具有抗腫瘤、降血膽固醇等成分（Kabir *et al.*, 1988; Breene, 1989），而藥用植物中已有許多具有降血糖功能，且其主要成分為多醣體（Tomoda *et al.*, 1990），因此，開發食藥用菇類作為機能性食品保健成分來源之研究，日益受到重視。從菇類子實體或菌絲體的萃取液中，可得到的藥效成分包括多醣類（polysaccharides）、三萜（triterpenoids）、蛋白質（proteins）、核酸（nucleic acids）、固醇類（steroids）、幾丁質（chitin）及不消化性多醣（食用纖維）等，如多醣類其藥效即是抗腫瘤活性（Miyazaki and Nishijima, 1981），能增強免疫機能的一種生物反應修飾劑（biological response modifier, BRM）。真菌細胞壁分為兩大部分，第一部分為初級結構（primary structure），其含有幾丁質（chitin）、 β -1-3 glucan及glycan。而第二部分即為黏膜結構（mucous structure），由 β -1-4 glucan和 β -1-6 glucan組成，還有黑色素包含其間。而靈芝子實體是堅硬而且具有韌性，由眾多絲狀細胞組成之皮革狀物，經初步分析，其中之成份為幾丁質約佔40%，而 β -glucan之可溶性多醣約佔60%（Haak-Frendscho, 1993）。

三、材料與方法

（一）、靈芝糖幾丁聚醣之製備

1. 松杉靈芝殘渣之前處理：

將已經過熱水萃取兩次後所得之松杉靈芝殘渣經烘箱（50°C）乾燥後，再以磨粉機磨碎，密封在塑膠瓶中，保存於乾燥箱中備用。

2. 松杉靈芝殘渣幾丁聚醣之製備：

依據（Kurita *et al.*, 1993）之方法並改良，製備不同去乙醯程度之靈芝糖幾丁聚醣，經冷凍乾燥後備用。

（二）、靈芝殘渣、糖幾丁質及靈芝糖幾丁聚醣一般成份分析

1. 水分之測定 (食品分析方法手冊, 1990; AOAC, 1984) :

$$\text{水分含量 } A (\%) = \{ [W_1 - (W_2 - W)] / (W_1) \} \times 100$$

2. 灰分之測定 (食品分析方法手冊, 1990; AACC, 1984) :

$$\text{灰分含量 } (\%) = [(W_2 - W_1) / W] \times 100$$

3. 脂質之測定 (食品分析方法手冊, 1990; AOAC, 1984) :

$$\text{脂質含量 } (\%) = [(W_2 - W_1) / W] \times 100$$

4. 蛋白質之測定 (食品分析方法手冊, 1990; AOAC, 1984) :

$$\text{蛋白質含量 } (\%) = [4.38^* \times 0.014^{**} \times (V_1 - V_2) \times M \times F / W] \times 100$$

M : Molarity of HCl

F : 0.1 N HCl 之力價

* 菇類之氮係數 4.38 (Crisan and Sands, 1978) ; 米穀粉之氮係數 5.95

** 相當於 1 ml 之 1 N HCl 的氮量 (g)

5. 粗纖維之測定 (食品分析方法手冊, 1990; AOAC, 1984) :

$$\text{粗纖維量 } (\%) = [(W_1 - W_2) / W] \times 100$$

6. 還原糖之測定 (James, 1995) :

採用 DNS (dinitrosalicylic acid) 法測定還原糖。取 1 ml 稀釋液與 DNS 試劑混合，於 100°C 下加熱 5 分鐘後加入 5 ml 蒸餾水，使用分光光度計 (Hitachi U-2001 Spectrophotometer)，於波長 540 nm 測定其吸光值，樣品粉末還原糖含量依標準葡萄糖之檢量線定量之。

7. 總糖含量之測定 (Dubois *et al.*, 1956) :

本試驗以酚-硫酸呈色法測定。

$$\text{樣品總糖含量 } (\%) = \{ (\text{迴歸之樣品濃度} \times 10^{-6} \times Fd \times V \times F_{MW}) / [S_0 \times (1 - MC\%)] \} \times 100$$

Fd : 稀釋倍數

V : 原樣品的定量之毫升數

F_{MW} : 樣品與標準品分子量相關係數 (單糖/多糖 = 0.9)

S₀ : 樣品乾重 (g)

MC : 水分含量 (%)

(三)、靈芝糖幾丁聚糖去乙醯度測定

以傅立葉轉換紅外光譜分析法測定去乙醯程度，以 Fourier 轉換紅外光譜吸收儀 (FT-IR spectrometer, Model FTS-155, Bio-Rad, USA) 進行測試，以 amide I: 1655 cm⁻¹ 之吸收值除以 3450 cm⁻¹ 吸收值 (內標準) (Baxter *et al.*, 1992)，求出 N-乙醯化程度 (%)，再以 100% 減掉 N-乙醯化程度，即可以求得去乙醯度，其公式如下所示：

去乙酰程度(%) = 100 - (A 1655 / A 3450) × 115

A1655 : Amide I在1655 cm⁻¹之吸收值

A3450 : O-H bond在3450 cm⁻¹之吸收值

(四)、不同去乙酰度靈芝糖幾丁聚醣結構分析

1. 分子量之測定 (Leung *et al.*, 1997)

利用膠體層析法進行分子量測定，將膠體充填並平衡膠體層析管柱後，以5 mg/ml Blue dextran測定層析管柱之柱床體積(void volume)，確定沖提液中無糖反應後，以濃度10 mg/ml之樣品溶液注入膠體管柱層析，以ISCO UA-6 absorbance detector於280 nm偵測透流液的吸光值，再以區分液收集器 (fraction collector, ISCO Retriever-500) 收集之。將收集的樣品溶液以酚-硫酸呈色法測定其總醣之呈色，再利用糊精標準品初步測定多醣之分子量。

溶析條件如下：

Column: Pharmacia Biotech LC column (1.6 × 700 mm)

Gel: Sephacryl™ S-200 HR

Mobile phase: 0.25 M CH₃COOH/ 0.25 M CH₃COONa

Sample Concentration: 10 mg/ml

Flow rate: 0.4 ml/min, 4.8 ml/tube

標準糊精為dextran MW 140000, 71327, 40000, 10000, 8000。稱取5 mg之各標準品，溶於使用的沖提液中，通過膠體管柱後以酚-硫酸法於488 nm下測定其吸光值，再由各標準品最大吸光值之溶析體積與各分子量對數值作圖，並製作迴歸曲線，計算靈芝糖幾丁聚醣之對應分子量。

2. 結構分析

X光繞射之分析 (Zobel *et al.*, 1964)：樣品以Rigaku III X-ray diffractometer (WAXD 廣角X-ray繞射分析) 進行X-ray繞射分析；使用銅靶 ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) 為X光繞射源，Cu K_{\alpha}輻射 (40 KV, 30 mA)，掃描角度2 θ 由2°~50°，掃描速度為4°/min；所得結果得以顯示樣品之微結構與結晶情形。

(五)、統計分析

本研究之實驗數值均為三重複，以統計分析系統Statistical Analysis System (SAS) 軟體進行統計分析，以ANOVA程序作變異分析，並且以Duncan's Multiple Range tests作顯著性差異的比較 (P < 0.05)。

四、結果與討論

靈芝殘渣經由 1N 氫氧化鈉溶液去除蛋白質後再以高錳酸鉀溶液和草酸溶液進行脫色後所製得的糖幾丁質產率為 56.43%。靈芝殘渣去乙醯物質的去乙醯度在製備過程中，受 NaOH 溶液的濃度、反應時間與反應溫度影響很大，其中以反應時間影響最大 (Chang *et al.*, 1997; Methacanon *et al.*, 2003; Ho and Wu, 2000; Prashanth *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2001)。結果顯示，靈芝殘渣糖幾丁質以 60% 氫氧化鈉溶液經 5 及 10 小時進行去乙醯作用後，糖幾丁聚醣之產率為 27.62~30.48%。

一般菇類約含有 85~95% 之水分，而其風乾物水分含量約為 5~20% (Breene, 1990)。靈芝殘渣、糖幾丁質與靈芝殘渣去乙醯物質一般成份分析結果，總醣含量，靈芝殘渣去乙醯物質 (49.71%) > 糖幾丁質 (24.69%) > 靈芝殘渣 (14.32%)，這是因為松杉靈芝經過兩次熱水萃取，一些可溶性的糖質成份被溶出，所以其總醣含量會較糖幾丁質及靈芝殘渣去乙醯物質少。還原糖部分，靈芝殘渣去乙醯物質 (20.34%) > 靈芝殘渣 (10.47%) > 糖幾丁質 (7.74%)。靈芝殘渣、糖幾丁質及靈芝殘渣去乙醯物質之粗灰分含量分別為 1.22%、3.12% 與 8.42%。靈芝殘渣去乙醯物質之灰分明顯較靈芝殘渣及糖幾丁質高，可能原因為在去除蛋白質過程及去乙醯時使用 NaOH 溶液，造成氫氧化鈉之鈉離子與靈芝殘渣去乙醯物質及糖幾丁質鍵結，或者是一些鹼溶性無機鹽類和蛋白質溶出，故靈芝殘渣去乙醯物質及糖幾丁質之灰分含量較高。

菇類纖維質最主要的部分是來自其細胞壁的成份 N-acetylglucosamine 聚合物—幾丁質 (chitin)。一般而言，食用菇之纖維含量約為乾物重 3~32% (Crisan and Sands, 1978)。由結果得知，粗纖維量靈芝殘渣 (78.66%) > 糖幾丁質 (64.88%) > 靈芝殘渣去乙醯物質 (29.47%)，靈芝殘渣與糖幾丁質二者之粗纖維含量較高的原因可能為成熟的靈芝在生長過程中木質化程度較高所造成之結果 (曾, 2004)。一般食用菇類風乾物蛋白質含量約為 20~50% (香川, 2004)。靈芝殘渣之粗蛋白含量 8.12%，含量明顯高於糖幾丁質 (4.37%)，然而靈芝殘渣去乙醯物質在粗蛋白含量高，可以得知是因為隨著去乙醯時間的增加，其蛋白質含量也隨之增加，這是因為乙醯基被去除而產生游離胺基，所以蛋白質之含量也會隨之增加。

以傅立葉轉換紅外光譜分析法及測定去乙醯程度為 89.63%，以膠體滲透層析法 (GPC) 來測定靈芝殘渣去乙醯物質之分子量，以不同分子量 (Mw 140000, 71327, 40000, 10000, 8000 Da) 之糊精 (dextran) 作為標準品，並在蛋白質最大吸收波長 280 nm 偵測吸光值而得知樣品層析出來之管數 (tube numbers)，利用酚-硫酸法水解多醣進行呈色分析，進而推算得知樣品之分子量。靈芝殘渣去乙醯物質與標準品曲線比對，推測得知其分子量為 54.23 KDa。靈芝殘渣去乙醯物質結構分析經由 X 光繞射 (X-ray) 測定，其 2θ 在 19° 及 20.7° 處有繞

射波峰，X-ray的結構分析中，靈芝殘渣去乙醯物質經鹼溶液的反應時間越久，其波峰越尖，表示其結晶區結構是緊密且規則。靈芝殘渣去乙醯物質經由示差掃描熱分析儀測定，發現其吸熱峰之熱焓值為135.49 J/g。

五、計畫結果自評

本計畫研究結果得知靈芝殘渣製備去乙醯物質的最適條件，其去乙醯度效果極良好，可用以提供保健食品開發及推廣之參考。

本計畫在執行上需要協助研究的人員且研究人員的素質要求也較高。由於本計畫除主持人外，另有中興大學食品暨應用生物科技學系毛正倫教授及本校（嘉南藥理科技大學生活應用與保健系）大學部學生參與，使其能如期完成，其計畫達成率為100%。本研究成果之學術參考價值極高，可供國內外的學術機構參考。本研究成果之應用價值極高，可立即推薦生技、農業單位或業者參考。最後，敝人對本研究成果報告自評等第為極佳。

六、參考文獻

林俊煌。1992。不同去乙醯程度之幾丁聚醣的流變性與鏈柔軟度、膜之物理特性的關係。

國立台灣海洋大學水產食品科學研究所碩士論文。基隆，台灣。

林文源。1995。幾丁聚醣抗菌作用之研究。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。台北，台灣。

食品分析方法手冊。1990。食品工業發展研究所。新竹，台灣。

香川芳子（監修）。2004。五訂食品成分表。女子營養大學出版部 p. 181-184。東京，日本。

陳介武。1996。食品添加物-抗氧化劑 Antioxidants。食品資訊 122: 46-52。

曾裕琇。2004。自不同栽培方法所得松杉靈芝產物之生理活性評估。國立中興大學食品科學系博士論文。台中，台灣。

賴慶亮譯。水野卓及正允川合原著。1997。菇類的化學、生化學，國立編譯館。台北，台灣。

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. Assoc. Offic. Anal. Chemists, Washington, D. C.

Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E. and Zilkakis, J. P. 1981. Chitin: New factets of research. Science. 102: 749-753.

Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. A., & Roberts, G. A. f. 1992. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. Inter. J. Biolo. Macrom., 14(6),

166-169.

Breene, W. M. 1989. Nutritional and medical value of exotic mushrooms- Shiitake mushrooms. A National Symposium and Trade Show in Minnesota.

Breene, W. M. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J. Food Protect.* 53: 883-894.

Chan, H. Y., Chen, M. H. and Yuan, G. F. 2001. Fungal chitosan. *Fung. Sci.* 16: 39-52.

Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J. and Fu, W. R. 1997. Heterogenous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Res.* 303: 327-332.

Crisan, E. V. and Sands, A. 1978. Nutritional value. In *The Biology and Cultivation of edible mushrooms*. Edt Chang, S. T. and Hayes, W. A. pp. 137-165. Academic Press, New York.

Davis, D. H. and Hayes, E. R. 1988. Determination of the degree of acylation of chitin and chitosan. *Meth. in Enzym.* 161:442-466.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

Grant, S., Blair, H. S. and Mckay, G. 1988. Water-soluble derivatives of chitosan. *Poly. Communic.* 29: 342-344.

Haak-Frendscho, M., Kino, K., Sone, T., Jardieu, P. 1993. Ling Zhi-8: a novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. *Cell. Immunol.* 150: 101-113.

Ho, P. Y. and Wu, F. C. 2000. The study of porous structure and its adsorption characteristics by using the squid cartilage base chitosan. *J. Technol.* 15: 503-509.

James, C. S. 1995. *Analytical Chemistry of Foods*. Chapman & Hall, London. 124-125.

Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, Y. 1998. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 34: 433-438.

Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food a challenge for food research and development. *Food technol.* 38: 85-97.

Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Nishimura, S. I. and Ishii, S. 1993. Reactivity characteristics of a

new form of chitosan. Polym. Bull. 30: 429-433.

Leung, M. Y. K., Fung, K. P. and Choy, Y. M. 1997. The isolation and characterization of immunomodulatory and antitumor polysaccharide preparation from *Flammulina Velutipes*. Immunopharmacology 35: 255-263.

Methacanon, P., Prasitsilp, M., Pothsree, T. and Pattaraarchachai, J. 2003. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. Carbohydrate Polymers. 52: 119-123.

Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. Chem. Pharm. Bull. 29: 3611-3616.

Muzzarelli, R. A. A. 1996. Chitosan-based dietary foods. Carbohydrated Polymers. 29: 309-316.

Muzzarelli, R. A. A. and Rocchetti, R. 1985. Determination of the degree of acetylation of chitosan by first derivative ultraviolet spectrophotometry. Carbohydrate polymer. 5: 461-472.

Prashanth, H. K. V., Kitture, F. S. and Tharanathan, R. N. 2002. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. Carbohydrate Polymers. 50: 27-33.

Tomoda, M., Shimizu, N., Gonda, R., Kanari, M., Yamada, H. and Hikino, H. 1990. Anti-complementary and hypoglycemic activities of the glycans from the seeds of *Malva verticillata*. Planta Medica 56: 168-170.

Zobel, H. F. 1964. X-ray analysis of starch granules. In "Method in Carbohydrate Chemistry". p.109. Vol. IV. ed. Whistler, R. L. Academic Press, New York.